

乳酸菌重组表达 TGEV、PEDV 和 RV 抗原蛋白的研究

黄海楠¹ 黄海鸥² 杨金生¹ 任锐¹ 邵洪泽¹

吕雪峰¹ 程荣华¹ 呼延含蓉³ 李昱洁¹ 丁世杰^{1*}

1. 吉林省畜牧兽医科学研究所, 长春 130062; 2. 吉林省长春市动物检疫站, 长春 130000;

3. 吉林省动物疫病预防控制中心, 长春 130000

摘要 乳酸菌能够耐受动物胃肠道中高浓度的胆盐和多种酶类, 在肠壁上黏附定植, 同时对宿主的免疫系统有调节作用, 特别是能诱导 sIgA 的分泌, 产生更为理想的黏膜免疫效果, 进而引起全身性系统免疫反应。因此将猪传染性胃肠炎病毒(TGEV)、猪流行性腹泻病毒(PEDV)和猪轮状病毒(RV)这 3 个具有肠组织嗜性的腹泻病毒的主要保护性抗原基因在乳酸菌中表达, 以期为胃肠道疾病的预防提供一种新的途径。

关键词 传染性胃肠炎病毒(TGEV); 猪流行性腹泻病毒(PEDV); 猪轮状病毒(RV); 乳酸菌; 保护性抗原基因

猪腹泻类疾病是猪场常见疾病, 全年易感, 冬春季节暴发流行, 可感染各年龄猪只, 对仔猪危害尤为严重, 2 周龄以内仔猪死亡率可达 100%。由腹泻引起的免疫力低、易混合感染、发育迟缓、延迟出栏、饲料报酬低等造成无法估计的经济损失, 严重影响我国的养猪业。其中危害较为严重的病毒就是猪传染性胃肠炎病毒(TGEV)、猪流行性腹泻病毒(PEDV)和猪轮状病毒(RV)。这 3 个腹泻病毒都具有明显的肠道组织嗜性, 主要感染肠道黏膜, 因此肠道黏膜表面 sIgA 含量的高低直接决定临床疾病的发生和疾病的严重程度。

乳酸菌能够适应动物胃肠道中高浓度的胆盐, 耐受消化道内的各种酶类, 在肠壁上黏附定植, 迅速繁殖成为优势菌群, 同时对宿主的免疫系统有免疫调节作用, 特别是能诱导 sIgA 的分泌, 增强宿主的黏膜免疫反应, 因此, 对于主要侵害消化道的猪轮状病毒、猪传染性胃肠炎病毒和猪流行性腹泻病毒来说, 利用乳酸菌表达其主要保护性抗原基因, 可以产生更为理想的黏膜免疫效果。

1 材料与方法

1.1 材料

1) 毒株、细胞和菌株。病毒 TGEV、PEDV 和 RV 为本室分离并保存在 -80 °C。猪肾传代细胞 IBRS2, 非洲绿猴肾细胞 Vero, 猴胚胎肾上皮细胞 Marc-145 均购自武汉中国典型物保藏中心。冻干的乳酸菌由本室分离并保存在 -80 °C。JM109 感受态细胞购自北京全氏金生物技术有限公司。

2) 试剂。犊牛血清、胰酶、MEM 培养基、谷氨酰胺、细胞培养瓶、DEPC 水均购自北京鼎国生物公司。Trizol 试剂购自 GIBCO 公司。Ex Taq DNA 聚合酶、dNTP (2.5 mmol 与 10 mmol)、T4DNA 连接酶、各种限制性内切酶、pMD 18T 载体、DL 2000 和 DL 15000 Marker 为 TaKaRa 宝生物工程(大连)公司产品; RT-PCR 试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒(DNA Gel Extraction Kit) 均购自 TIANGEN BIOTECH 公司。琼脂糖、溴化乙锭(EB)均购自 AMRESCO 公司。在大肠杆菌与乳酸菌中都能表达的穿梭载体 pMG36e 是由笔者所在研究室保存。红霉素为 Sigma

收稿日期: 2017-04-01

基金项目: 吉林省科技发展计划项目(20140101030JC)

* 通讯作者

黄海楠, 女, 1981 年生, 博士, 副研究员。

公司产品;其他试剂均为国产分析纯。

1.2 抗原基因片段的克隆

1) 根据 TGEV S 蛋白的 AD 片段的基因序列, PEDV S 蛋白的 498~638 aa 片段的基因序列, 以及 RV 的 VP4 基因 5' 端抗原结构功能区的基因序列, 利用 Primer 5.0 软件分别设计 PCR 引物 S1、S2、P1、P2 和 V1、V2 前后分别添加相应的酶切位点。所有引物均是由 TaKaRa 宝生物工程(大连)公司合成的 PAGE 级。

S1: (*Sma* I) 5'GGGCCCCGGGATGACTCTTGAAA
TTTCAT 3'

S2: (*Bam*H I) 5'CGGGGATCCTTTTATAACAGCT
GTGGCAT 3'

P1: (*Spe* I) 5'CCAACTAGTCCAATTTCTTTTGT-
TAC 3'

P2: (*Hind* III) 5'GGCAAGCTTCTAAACGTCCGT-
GACA 3'

V1: (*Bam*H I) 5' GAC GGATCC ATG GCTTCG
CTC ATT TAT AGA CAA 3'

V2: (*Spe* I) 5' ATTACTAGT AGC TCT TGT
GTG CAC TAT CTC TCT 3'

2) 提取 RNA。将 TGEV 以 1MOI 的剂量接种长满单层的 IBRS2 细胞, PEDV 接种长满单层的 Vero 细胞, RV 接种长满单层的 Marc-145 细胞, 待 90% 的细胞出现病变后, 收集病变的细胞 Trizol 法提取总 RNA(按试剂使用说明操作)。所有离心管和枪头都用 DEPC 水处理过, 保证确实没有 RNA 酶。

3) 反转录。反转录体系: Oligo dT18(500 μ g/mL) 1 μ L, dNTP(10 mmol) 1 μ L, M-MLV(200 U) 1 μ L, 5 \times M-MLV Buffer 4 μ L, RNasin(40 U/ μ L) 1 μ L, RNA 模板 12 μ L 混匀, 轻微离心后 42 $^{\circ}$ C 60 min, 获得的 cDNA 模板直接用于 PCR。

4) PCR 扩增。10 \times Taq Polymerase Buffer 2 μ L, 上下游引物 S1 和 S2 (P1 和 P2, V1 和 V2) 各 0.5 μ L, dNTP (2.5 pmol) 1 μ L, MgCl₂ 1 μ L, DMSO 1 μ L, Taq plus DNA polymerase 1 μ L, DNA 模板 13 μ L。

扩增 TGEV 的 S1 片段全长约 730 bp, 位置位于 S 蛋白的 1.1 kb 左右, 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 90 s, 63 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。

扩增 PEDV 的 S2 片段全长约 450 bp, 位置位

于 S 蛋白的 1.5 kb 左右, 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 90 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。

扩增 RV 的 VP 片段全长约 760 bp, 位置位于 VP4 蛋白的 10 bp 左右, 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 90 s, 59 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。反应结束后取 5 μ L PCR 产物电泳。按 DNA 回收试剂盒说明书操作回收正确的 PCR 产物。

5) 连接与转化。回收的 PCR 产物连接 T 载体, 体系如下: pMD18-T 1 μ L, Ligation Mix 5 μ L, 回收纯化的 PCR 产物 4 μ L, 16 $^{\circ}$ C 过夜; 将连接产物 10 μ L 加入至 100 μ L JM109 感受态细胞中, 按照转化步骤操作, 最后留 100 μ L 上清混匀后涂布于 LB 琼脂平板上 (Amp 抗性 100 μ g/mL), 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。

6) 质粒的酶切鉴定。

① 挑取琼脂板上的单个菌落, 分别接种于 5 mL 的 LB 液体培养基中 (含氨苄 100 μ g/mL), 37 $^{\circ}$ C 200 r/min 过夜培养。

② 用 DNA 小提试剂盒, 提取质粒, 取 5 μ L 电泳鉴定, 5 μ L 酶切鉴定, 剩余置于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

③ 根据序列分析 S1 片段选择用 *Bam*H I 单酶切, *Eco*R I 和 *Sal* I 双酶切鉴定(单酶切 30 $^{\circ}$ C 2 h, 双酶切 37 $^{\circ}$ C 4 h); S2 片段用 *Hind* III 和 *Spe* I 双酶切鉴定; VP 片段用 *Bam*H I 和 *Spe* I 双酶切鉴定。反应结束后, 取 5 μ L 反应产物电泳, 鉴定正确的阳性质粒送 TaKaRa 公司测序。

1.3 穿梭表达载体质粒的构建

1) 质粒 pMD18T-S2-VP 的构建。

① 双酶切与连接: 将质粒 pMD18T-S2 和 pMD18T-VP 分别用 *Spe* I 和 *Hind* III 双酶切, 质粒 pMD18T-S2 双酶切后回收约 450 bp 的片段, 质粒 pMD18T-VP 双酶切后回收约 3.4 kb 的片段, 然后用 T4 DNA 连接酶 16 $^{\circ}$ C 连接过夜。

② 转化与质粒鉴定: 将连接产物 20 μ L 全部用于转化。挑取转化后的菌落, 提取质粒, 取 5 μ L 电泳鉴定, 5 μ L 酶切鉴定, 剩余置于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存。用 *Xba* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定, 正确酶切可见到约 1.2 kb 和约 2.7 kb 的 2 个片段。

2) 质粒 pMD18T-S1-VP-S2 的构建。

①双酶切与连接。要将 pMD18T-S1 和 pMD18T-S2-VP 分别用 BamH I 和 Sma I 双酶切, pMD18T-S1 回收约 740 bp 的片段, pMD18T-S2-VP 回收约 3.9 kb 的片段。将 2 个回收的片段, 用 T4 DNA 连接酶 22 °C 连接过夜。

②转化与质粒鉴定。将连接产物 20 μL 全部用于转化。挑取转化后的菌落, 提取质粒, 取 5 μL 电泳鉴定, 5 μL 酶切鉴定, 剩余部分置于 -20 °C 冰箱保存。用 Xba I 和 Hind III 双酶切鉴定, 正确酶切可见到约 2 kb 和约 2.7 kb 的 2 个片段。

3) 穿梭表达载体质粒 pMG36e-S1-VP-S2 的构建。

①双酶切与连接。将鉴定正确的质粒 pMD18T-S1-VP-S2 和载体质粒 pMG36e, 分别用 Sma I 和 Hind III 双酶切, 载体回收大片段, 重组质粒 pMD18T-S1-VP-S2 回收约 2 kb 的片段, 然后用 T4 DNA 连接酶 16 °C 连接过夜。

②转化与质粒鉴定。将连接产物 25 μL 全部用于转化。转化后的菌落提取质粒, 取 5 μL 电泳鉴定, 5 μL 酶切鉴定, 鉴定正确的质粒送 TaKaRa 公司测序。

1.4 益生乳酸菌的扩增培养

1) 复苏培养。将冻干的乳酸菌用 MRS 培养基溶解后, 在 MRS 琼脂平板上划线, 37 °C 培养 24 h, 挑单菌落接种 4 mL MRS 培养基 37 °C 静置厌氧培养 24 h 复苏。

2) 乳酸菌感受态的制备。

①将过夜培养物以 2% 的比例接入 20 mL MRS 培养基中, 37 °C 静置厌氧培养约 4 h 左右。当细胞生长到 OD₆₀₀ 值为 0.5 ~ 0.8 时, 0 °C 8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体沉淀。

②用冰冷的 PEB 电击缓冲液悬浮沉淀, 0 °C 8 000 r/min 离心 5 min 洗细胞 2 次。沉淀悬浮于 600 μL 冰冷的电击缓冲液中, 分装 200 μL/管备用(现用现制备)。

1.5 含有 3 个抗原基因片段的乳酸菌的构建和鉴定

1) 重组质粒 pMG36e-S1-VP-S2 的乳酸菌电穿孔转化。

①取新制备的乳酸菌感受态冰上放置 5 min, 加入 10 μL 重组质粒, 混匀, 冰浴 5 min。

②用预冷的枪头将重组质粒和细菌混合物移至 0.2 cm 内径预冷的电穿孔杯中, 设置电穿孔仪脉

冲电压为 2.5 kV, 脉冲时间为 3.5 ms。

③将电击混合物移入一新的预冷的 1.5 mL 离心管中, 冰浴 5 min, 加入 500 μL 普通 MRS 培养基, 37 °C 静置培养 3 ~ 4 h。

④取 50 μL 培养物涂布 MRS 固体培养皿(含红霉素), 37 °C 静置厌氧培养 48 h, 观察菌落形态。

2) 乳酸菌重组质粒的鉴定。

①乳酸菌重组质粒的提取。

A. 平板上挑取单个菌落, 分别接种于 MRS 培养基(含红霉素)中, 37 °C 培养过夜后, 4 °C 8 000 r/min 离心 10 min 收集 10 mL 过夜培养的乳酸菌菌体。

B. 沉淀用 0.1 mol Tris 溶液洗涤(pH 7.5), 加入 25% 蔗糖(内含 30 mg/mL 溶菌酶)的溶菌液 200 μL, 37 °C 水浴 15 min。加入 3% 的 SDS 和 0.2 mol/L 的 NaOH 的混合液 400 μL, 立即混匀在室温下放置 7 min。

C. 加入预冷的醋酸钠(pH 4.8) 300 μL, 立即混匀, 4 °C 5 000 r/min 离心 15 min。去上清, 沉淀用 320 μL 二馏水溶解, 加入 7.5 mol/L 醋酸铵(内含 0.5 mg/mL 的 EB) 200 μL 和酚-氯仿混合液 350 μL, 立即混匀, 4 °C 8 000 r/min 离心 5 min。

D. 将上清移至新的 1.5 mL 离心管中, 加入 1 mL 冰冷的无水乙醇, 混匀后室温放置 30 min, 4 °C 8 000 r/min 离心 15 min。移去上清, 用 70% 乙醇洗沉淀, 并溶于 40 μL(含 RNase 0.1 mg/mL) 纯水中, -20 °C 保存备用。

②酶切鉴定。用 Sca I 和 Hind III 双酶切乳酸菌重组质粒 pMG36e-S1-VP-S2, 正确的质粒可以酶切出 3.7 kb 和 2 kb 的片段。

③PCR 鉴定。用引物 S1 和 S2, P1 和 P2, V1 和 V2 鉴定。

④免疫印迹(Western-blot)。

A. 将重组菌接种于 5 mL 含红霉素的 MRS 液体培养基中, 37 °C 静置过夜厌氧培养。

B. 取 2 mL 接种于 100 mL 含红霉素的 MRS 液体培养基中, 在培养基中添加 40 mmol DL- 苏氨酸, 37 °C 静置厌氧培养至 OD₆₀₀ 值为 0.6 ~ 0.8。以同样的方法诱导含空载体 pMG36e 的乳酸菌作对照。取菌液 1.4 mL, 12 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液。

C. 沉淀用 200 μL STE 溶液悬浮, 12 000

r/min 离心 3 min, 弃上清; 加入 100 μ L 溶菌酶(10 mg/mL), 37 $^{\circ}$ C 水浴放置 30 min, 沸水煮 5 min, 灭活溶菌酶, 12 000 r/min 离心 3 min, 弃上清; 加入 50 μ L 1 \times SDS 上样缓冲液 50 μ L (含 1/10 的 DTT), 充分混匀, 沸水煮 10 min, 25 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清 20 μ L 上样, 以蛋白质标准分子质量为参考, 在 12%SDS-PAGE 上进行电泳分析。

D. 将凝胶固定于电泳装置上, 加入足够量的 Tris-甘氨酸电泳缓冲液, 在加样孔中分别加入样品; 电泳电压 120 V, 电流在 20~40 mA 范围内, 电泳至溴酚蓝出胶底面, 终止电泳。

E. 将 PAGE 凝胶上的表达产物利用转印仪转印到硝酸纤维素膜上, 加入封闭液(0.5% 聚乙烯醇的 0.01 mol/LPBS 液) 封闭, 0.01 mol/L PBST 洗 3 次, 每次 5 min; 依次加入一抗(经猪传染性胃肠炎病毒攻毒的鼠血清 1:200 稀释), 二抗(1:5 000 稀释的辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG)。最后将膜浸入 10 mL 4-氯-1-萘酚底物显色溶液中显色 20 min 并观察结果。

2 结果

2.1 抗原基因片段的克隆结果

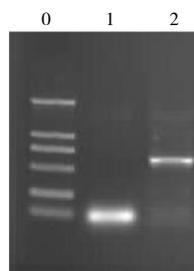
S1 片段 PCR 扩增全长约为 730 bp, 结果见图 1, 用 *Bam*H I 单酶切以及 *Eco*R I 和 *Sal* I 双酶切鉴定都是切出约 2.7 kb 和 740 bp 的 2 个片段, 结果见图 2。

S2 片段 PCR 扩增全长约为 450 bp, 结果见图 3, 用 *Hind* III 和 *Spe* I 双酶切鉴定可见约 2.7 kb 和 450 bp 左右的 2 个片段, 结果见图 4。

VP 片段 PCR 扩增全长约为 760 bp, 结果见图 5, *Bam*H I 和 *Spe* I 双酶切可见约 2.7 kb 和 760 bp 左右的 2 个片段, 结果见图 6。

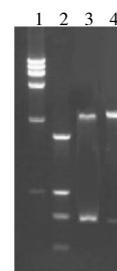
2.2 穿梭表达质粒的鉴定结果

质粒 pMD18T-S2-VP 用 *Xba* I 和 *Hind* III 双酶切, 酶切可见约 1.2 kb 和约 2.7 kb 的 2 个片段, 酶切结果见图 7。质粒 pMD18T-S1-VP-S2 用 *Xba* I 和 *Hind* III 双酶切, 酶切可见约 2 kb 和约 2.7 kb 的 2 个片段, 酶切结果见图 8。穿梭表达载体质粒 pMG36e-S1-VP-S2 用 *Sca* I 和 *Hind* III 双酶切, 酶切可见约 2 kb 和约 3.7 kb 的 2 个片段, 酶切结果见图 9。



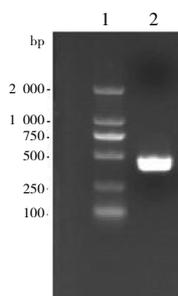
0: DL2000; 1: 阴性对照;
2: 鉴定为阳性的片段

图 1 PCR 结果



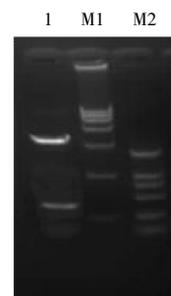
1: DL15000; 2: DL2000;
3: 双酶切结果; 4: 单酶切结果

图 2 酶切结果



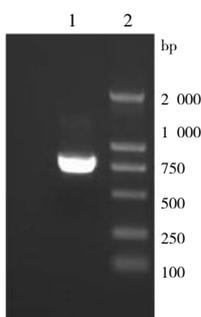
1: DL2000; 2: 阳性质粒

图 3 PCR 鉴定结果



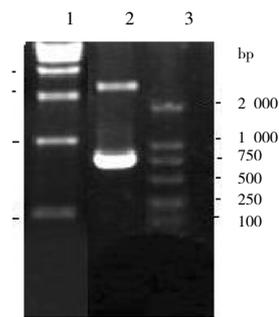
1: 双酶切结果; M1: DL15000;
M2: DL2000

图 4 酶切结果



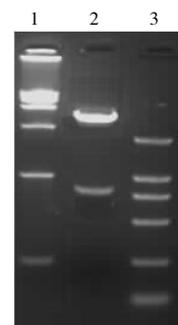
1: 阳性质粒; 2: DL2000

图 5 PCR 鉴定结果



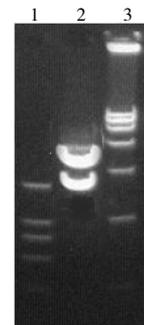
1: DL15000; 2: 双酶切结果;
3: DL2000

图 6 酶切结果



1: DL15000; 2: 双酶切结果;
3: DL2000

图 7 质粒 pMD18T-S2-VP 的酶切结果

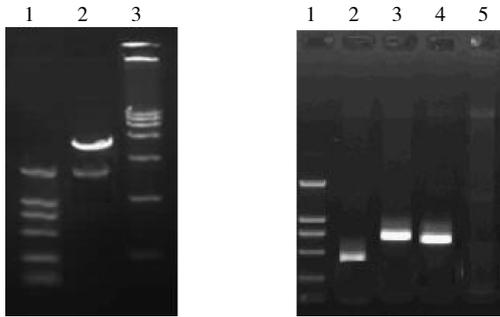


1: DL15000; 2: 双酶切结果;
3: DL2000

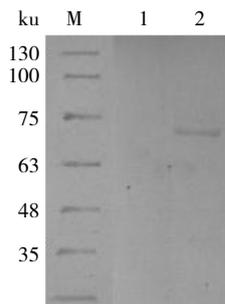
图 8 质粒 pMD18T-S2-VP-S2 的酶切结果

2.3 含有 3 个抗原基因片段的乳酸菌的鉴定结果

1) 穿梭表达载体质粒 pMG36e-S1-VP-S2 分别



1:DL2000;2:双酶切结果; 3:DL15000
 1:DL2000;2:P1/P2; 3:V1/V2;4:S1/S2;5 阴性对照
 图 9 质粒 pMG36e-S1-VP-S2 的酶切结果
 图 10 pMG36e-S1-VP-S2 的 PCR 鉴定结果



M:蛋白 marker;1:空白对照;2:阳性条带
 图 11 western 鉴定结果

用引物 S1 和 S2,P1 和 P2,V1 和 V2 进行 PCR 扩增鉴定,结果见图 10。

2)免疫印迹(Western-blot)结果。经计算插入的基因共同表达的蛋白约 70 ku。取 OD 值 0.8 的菌液做 Western 鉴定,结果如图 11。

3 讨论

3.1 表达靶基因的选择

TGEV 的纤突糖蛋白(S 蛋白)携带主要的 B 淋巴细胞抗原决定簇,诱导中和抗体,决定宿主细胞亲嗜性、致病性、细胞融合和血凝作用有 4 个抗原位点——A、B、C、D。A 和 D 位点高度保守缺失可导致 S 蛋白丧失产生中和抗体的能力。因此本研究选择了扩增 TGEV S 蛋白的 1 102~1 818 bp 片段^[1-2]。

PEDV 的纤突 S 蛋白可以辨别靶细胞,促进病毒和细胞膜的融合,同时也诱导宿主体液免疫反应^[9]。韦显凯等^[10]构建了表达 PEDVS 蛋白 1~638 aa,498~638 aa,638~1 384 aa 3 个片段的重组腺病毒免疫小鼠均能产生 ELISA 抗体,其中 498~638 aa 片段产生的抗体最高。有报道发现,S 蛋白上大量与免疫原性无关的表位会对中和表位起到干扰作用,甚至会引发机体的过度免疫反应^[9]。因此,本研

究选择了扩增 PEDV S 蛋白的 1 492~1 923 bp 片段。

猪轮状病毒的 VP4 和 VP7 共同组成病毒衣壳的纤突,均高度可变,可独立诱导产生中和抗体。由于 VP7 的抗原决定簇多是构象性的,空间型复杂,排列规律不明显,因此,国内外学者先后在大肠杆菌、杆状病毒、腺病毒中表达成功,并获得融合蛋白,但由于构象不同,影响产生中和抗体的能力,免疫效果不理想。而 VP4 可介导病毒的早期吸附与易感细胞的进入,自然感染时能够刺激机体产生中和抗体,而且其抗原决定簇大多为线性表位,因此本研究选择了扩增 VP4 基因 5' 端长 10~754 bp 的主要抗原结构功能区。

3.2 载体菌的选择

这 3 个病毒都是通过消化道感染肠绒毛上皮细胞,导致肠绒毛萎缩、脱落,引起动物消化紊乱,酸中毒甚至脱水。因此,黏膜免疫是防治病毒性腹泻的主要途径。肠道黏膜表面 sIgA 含量的高低直接决定临床疾病的发生和疾病严重程度。

乳酸菌能耐受胃液中的胃酸以及肠液中的胰蛋白酶和胆汁,在胆汁酸盐浓度高达 0.3% 时,仍能缓慢生长。同肠胃外免疫途径相比,通过口服免疫,可以诱发 IgA 产生,具有良好的食用安全性、消化环境耐受能力和肠道定植能力,以及免疫佐剂的作用符合益生菌的基本特征。因而构建乳酸菌质粒载体,表达在黏膜系统中增殖的病原微生物的保护性抗原基因,制备绿色环保、可食用的多功能黏膜免疫的微生物制剂疫苗应用前景广阔^[6-10]。

本研究针对腹泻发生和免疫的特点,将乳酸杆菌的益生性和疫苗的免疫预防作用有机结合起来,在试验设计上以阻断肠道传染性病原感染的第一道防线为目的,利用安全无毒的乳酸菌表达系统在肠道黏膜上黏附、定植、表达及传递抗原物质,因而抗原物质对黏膜的免疫刺激作用更接近于病毒的自然感染途径,因此所产生的黏膜免疫保护效果将更为理想。为胃肠道疾病的预防提供了一种新的途径。以乳酸杆菌为载体的 DNA 疫苗系统的研究将为开发食品级疫苗,以及预防人类及动物肠道疾病提供新的思路。依靠本研究建立的技术平台,可以更换不同种类的动物,也可以转入多个不同病原保护基因,达到预防多种动物疫病的目的。